

1型、2型糖尿病動物モデルにおける血管内皮細胞由来弛緩因子の異常について

著者	小林 恒雄, 松本 貴之, 鎌田 勝雄
雑誌名	星薬科大学紀要
号	46
ページ	105-114
発行年	2004
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000116/

1型、2型糖尿病動物モデルにおける血管内皮細胞由来弛緩因子の異常について

小林恒雄, 松本貴之, 鎌田勝雄

星薬科大学 医薬品化学研究所 機能形態学研究室

Endothelium derived relaxing factors in animal models of Type 1 and Type 2 diabetes

Tsuneo KOBAYASHI, Takayuki MATSUMOTO and Katsuo KAMATA

Department of Physiology and Morphology, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University

1. はじめに

近年、日本人のライフスタイルの変化（高脂肪食の摂取や運動不足など）や高齢化社会に伴い糖尿病患者は激増しており、もはやマスコミ誌上にもしばしば取り上げられるほどの社会問題になりつつある。糖尿病は種々の合併症を誘発し患者のQOLを著しく損ない、かつ医療費の莫大な増加の一因ともなっている。糖尿病性慢性合併症には様々なものがあるが、なかでも網膜症、腎症、神経症は三大合併症と呼ばれ、細小血管障害によると考えられている。また、大血管障害の頻度も著しく高く、その主要な症状は、冠動脈、脳動脈、下肢動脈のアテローム性動脈硬化である。これら糖尿病状態における共通の合併症は、インスリンの絶対的不足あるいは作用の低下による高血糖状態を中心とした各種代謝異常や、血液学的異常から生じた循環器障害が原因で誘発される。糖尿病には、若年に発症するインスリン依存性糖尿病（1型糖尿病）と、成人で発症するインスリン非依存性糖尿病（2型糖尿病）に大別されるが、日本人では2型糖尿病の患者が約95%と圧倒的に多く、その患者の数はますます増加していると言われているが、その最終的障害（糖尿病性合併症）は1型、2型糖尿病ともに共通の障害として現れる。これら合併症に共通して観察される病理学的特徴として、血管障害があげられるが、なかでも血管の内側を一層に覆っている内皮細胞の機能障害が原因と考えられている。

血管内皮細胞は、多彩な生理機能を有し、血管の機能を調節している。その内皮細胞の重要性を示す説の一つとして古くから支持されているのが、Ross (1993) の傷害反応仮説 (response-to-injury hypothesis) である。これは動脈硬化症の進行過程において、血管内皮細胞に軽微な傷害あるいは機能的な傷害が起こり、その結果、様々な連鎖反応が生じ泡沫細胞を形成することを述べた仮説であるが、現在これらのメカニズムは徐々に明らか

になっている。1980年、Furchgottら (1980) によって、内皮細胞由来弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor; EDRF) のような血管弛緩物質が産生、放出されることが報告され、現在では、ほぼ一酸化窒素 (NO) であることが証明されている。また、副交感神経刺激によって平滑筋細胞膜が過分極することが知られており (Bolton *et al.*, 1984; Komori and Suzuki, 1987)、血管内皮細胞からNOとは異なる因子が遊離されることが、1988年にChenら (1988, 1991) によって報告された。この因子は、内皮細胞由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) と呼ばれている (Chen *et al.*, 1988, 1991; Chen and Suzuki, 1990)。

本総説では、1型、2型糖尿病モデル動物の血管機能における内皮細胞依存性弛緩因子の異常と原因について、EDRFとEDHFに焦点を絞り最近の研究を述べる。さらに、糖尿病時における血管異常の発症機構の一端が明らかになりつつあり、その原因物質についても解説する。

2. 糖尿病患者における内皮機能の異常

糖尿病モデル動物を用いた血管内皮機能についての報告は数多く存在するが、これらの動物モデルを用いたデータの目的は、いかに実際の糖尿病患者に当てはまるかであろう。ヒトにおける最初の血管内皮細胞機能不全の報告は、勃起不全を生じている糖尿病患者の陰茎平滑筋に関するものである (Saenz de Tejada *et al.*, 1989)。その後、様々な血管を用いて、1型、2型糖尿病患者の血管内皮依存性弛緩反応の減弱が報告された。しかし、糖尿病患者の血管内皮機能におけるデータは、まだ不足している。アセチルコリンを含むコリン作動薬による前腕抵抗血管の弛緩反応は、減弱しているとする報告と、小数ではあるが変化がないとする双方の報告がある (Calver *et al.*, 1992, Elliott *et al.*, 1993, Smits *et al.*, 1993)。大血管である冠動脈を用いた実験において、Nitenbergら (1993) は、1型、2型糖尿病患者はアセチ

ルコリンによる弛緩が減弱していることを示した。同様に、Clarksonら(1996)も、糖尿病時における全身性の大血管では、流れ負荷による弛緩が減弱していることを示している。一方、平滑筋細胞に直接作用することによって弛緩反応を生じるニトログリセリン化合物は、糖尿病患者において変化がないという報告が比較的多いが(McNally *et al.*, 1994, Ting *et al.*, 1996, Steinberg *et al.*, 1996)、弛緩の減弱もいくつか報告されている(Lambert *et al.*, 1996, Huvers *et al.*, 1997)。

このように糖尿病患者の大血管系、抵抗血管とも、内皮依存性弛緩反応が減弱している報告が多い。このことは、後に述べる動物を用いた実験結果とほぼ一致する結果であり、糖尿病時においては、ヒトや実験動物モデル共に、内皮細胞の機能不全が生じ、それが血管障害の発症に起因していると言ってよいだろう。

3. 糖尿病モデル動物における内皮細胞機能の異常

現在、糖尿病モデルとしては、20年以上前から薬物によって、高血糖すなわち糖尿病状態に近づけさせたモデルを用いて実験が行われている。そのほとんどは、ストレプトゾトシン(STZ)やアロキササンによって生じる膵臓のランゲルハンス島β細胞の破壊に伴うインスリン欠乏状態の1型糖尿病動物モデルである。このモデルの摘出血管を用いた多くの研究者は、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応の減弱を報告している(Oyama *et al.*, 1986; Kamata *et al.*, 1989a, b, 1996, 1997; Abiru *et al.*, 1990a, b, 1991; Miyata *et al.*, 1992; Abiru *et al.*, 1993; Tomlinson *et al.*, 1992; Poston and Taylor, 1995; Pieper, 1998; De Vriese *et al.*, 2000b)。これらの動物モデルは、STZ投与後1週間以内に高血糖を生じ、以後400-600 mg/dlの血中グルコース値を示す。しかし、胸部大動脈の血管内皮機能は、STZ投与後4週間ぐらいまで減弱せず、およそ8週間以降に減弱が生じる。このような報告は、我々を含め他の研究者も報告している(Kobayashi and Kamata, 1999a; Pieper, 1999)。さらに、Pieperら(1999)は、STZ投与後1週間後では弛緩反応が増加することを報告している。

同様に、我々は最近、自然発症2型糖尿病モデルであるGoto-Kakizaki(GK)ラットを用いた実験においても4-12週齢のラットでは、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応は増加しているが、36週齢後は、弛緩反応は減弱に移行することを見出した(Kobayashi *et al.*, 2004)。つまり、このような糖尿病モデルにおいては、発症期間に応じた二相性の内皮依存性弛緩反応を示す。血糖の増加後の初期においては、内皮依存性弛緩反応は、増加または不変であり、終期においては減弱する可能性がある。実際、2型糖尿病患者の初期においては、血流

の増加が生じることが報告され(Jaap and Tooke, 1995)、ヒトおよび実験動物において一致した結果である。このような結果が、糖尿病患者における内皮機能の結果の矛盾を生じさせていると考えられるが、さらに検討する必要がある。

4. 1型糖尿病モデルにおけるEDRFの異常

糖尿病動物における減弱した内皮依存性弛緩反応は、必ずしもNOの合成や、その活性によって影響を受けているとは限らない。しかし、内皮依存性弛緩反応はほとんどの血管において、NOが弛緩に強く関与していることを考えると、やはりNOの合成や活性に焦点が絞られる。事実、糖尿病ラット胸部大動脈においては、このEDRFのNOにおける機能低下の報告が多数を占めている。そのほとんどが、平滑筋細胞内に入ってからNOを産生するニトログリセリン化合物等による弛緩反応は変化しないと報告しているので、cyclic GMP以降の平滑筋弛緩シグナリングにおいては影響がないと考えられる。ラット胸部大動脈において、アセチルコリンによって刺激を受けた内皮細胞はNOを産生し、平滑筋内に移行し、可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、cyclic GMPを産生して平滑筋を弛緩する。Kamataら(1989)は、STZ糖尿病ラット大動脈において、アセチルコリンによって刺激した時のcyclic GMP産生量を測定した。その結果、糖尿病群においてcyclic GMP量は著明に低下していた。これは、内皮細胞から生じるNOの活性または合成が低下していることを示している。そこで実際に血管内皮細胞からアセチルコリン刺激によるNO産生は、糖尿病時において低下しているのか検討を行う必要がある。しかし、血管内皮細胞から生じるNOを直接測定した報告は少ない。我々は、ラット大動脈を用いてアセチルコリン刺激時におけるNOの代謝産物である NO_2^- 、 NO_3^- の測定を行った(Kobayashi *et al.*, 2001)。その結果、STZ糖尿病ラットにおいて、 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ の産生量は、コントロールラットに比べ、有意な差は見られなかった。さらに、構成型NO合成酵素であるendothelial NO synthase(eNOS)のmRNAを測定した。その結果、糖尿病時においては、 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ の産生量と同様にeNOS発現も変化は見られなかった。これらのことから、内皮細胞におけるNOの産生量には変化がないことが考えられる。

Hinkら(2001)は、STZ糖尿病ラットの大動脈において、電子スピン共鳴法によるNOの半減期の低下と、eNOS発現の増加を報告した。多くの摘出血管を用いた実験において、NOは活性酸素(スーパーオキシドアニオン等)によって不活化されることが知られているが、スーパーオキシドアニオンのスカベンジャーであるsuperoxide dismutase(SOD)の処置が、NOの不

活化を遅延し、糖尿病時の減弱した血管内皮機能を完全に改善することが報告されている (Tefamariam, 1994)。このことは糖尿病病態において、SODの発現が低下している事実と一致する (Kamata and Kobayashi, 1996)。近年では、糖尿病時において、スーパーオキシドアニオンの産生増加の原因として、NADPH oxidaseの活性亢進、および構成サブユニットの発現の増加によることが報告されている (Hink *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Kanie and Kamata, 2002)。以上のことは、STZ誘発糖尿病ラットに代表される1型糖尿病時におけるEDRF作用の減弱は、内皮細胞内でのeNOSによるNOの産生から平滑筋細胞内でのグアニル酸シクラーゼまでの間に存在する、つまりNOの不活化に焦点が絞られるのではないだろうか。

5. 1型糖尿病モデルにおけるEDRFの改善と治療

NOの活性は、活性酸素であるスーパーオキシドアニオンによって不活化され、またいくつかのNOスカベンジャーによって変化する。上述したように、SODの処置は、糖尿病時における内皮機能の減弱を改善する。一方、NOSによるNO合成は、NOの基質であるL-アルギニンやNO合成の補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH4) によって変化する。Pieperら (1997, 1998) は、L-アルギニンやBH4をin vivo, in vitro処置することによって、STZ誘発糖尿病ラットの内皮依存性弛緩反応の減弱を改善することを示した。L-アルギニンやSODによる血管機能の改善については他の総説も参考にされたい (Tefamariam, 1994; Pieper, 1998)。

一方、糖尿病時における治療効果を考える上で、インスリンによる血糖コントロールは重要である。最近の研究では、インスリンには血糖の低下作用の他に様々な作用があることが明らかになりつつある。一般に、糖尿病患者における正確なインスリン投与による血糖のコントロールは、血管合併症の進行を防ぐ。しかし、このようなインスリン処置は、初期の糖尿病状態の血管合併症を予防することにすぎず、つまり、進行した血管障害には、改善効果が弱いと考えられている。実際、そのことは糖尿病患者やSTZ誘発糖尿病ラット胸部大動脈による血管内皮機能の実験において示されている (Takiguchi *et al.*, 1988; The diabetes control and complications trial research group, 1993)。我々は、STZ処置後10週間経過した糖尿病ラットにおいて、高濃度インスリンの短期間投与を行い、減弱した内皮細胞機能の改善効果を検討した。その結果、1週間の高濃度インスリンの連続投与を行うと、eNOS発現、NO産生の過剰増加により内皮機能が劇的に改善することに成功した (Kobayashi and Kamata, 1999b, 2001)。また、培養細胞等により、インスリンがeNOS発現を増加することが示され (Kuboki

et al., 2000)、インスリンを補うことによる内皮細胞の機能改善が示されたと言える。一方で、血中のインスリンの増加は、血圧や動脈硬化の進行にも関与している (Standley *et al.*, 1993)。STZ誘発糖尿病ラットへの高濃度のインスリン処置は、血管に作用する成長因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 受容体の発現増加を介して、eNOSの過剰発現を生じる (Kobayashi and Kamata, 2002)。VEGFやIGF-1は、内皮細胞の増殖に関与する一方、動脈硬化の初期における進行に関与していることが示されている (Grant *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1998)。このインスリン処置による内皮機能改善効果は、一時的な機能亢進の可能性があり、インスリンの作用を含めさらなる研究が必要だろう。

高血圧モデル、高脂血症モデル、糖尿病モデル等においても共通して、血管内皮障害が生じるが、これらの病態モデルにおいて改善効果を示す薬剤として報告が多いのが抗酸化剤である (Keaney and Vita, 1995)。生体内における酸化は、血管細胞においても例外ではなく、その一つとして、low density lipoprotein (LDL) コレステロールは、生体内の活性酸素等により酸化され、生じた酸化LDLは、血管内皮機能に強く作用し、NO機能を抑制することが古くから知られている (Kugiyama *et al.*, 1990; Flavahan, 1992)。STZ糖尿病モデルにおいては、血中LDLの増加、LDL中の過酸化脂質の増加、変性LDLの酸化のしやすさなどが報告され、これらが血管内皮機能障害の原因であることが示されている (Kobayashi *et al.*, 2000)。糖尿病動物のLDLコレステロールを下げると内皮細胞の機能が改善する (Kamata *et al.*, 1996a,b,c)。さらに、我々の経時的変化の追跡実験では、STZ投与後4週間でLDLコレステロールの増加が生じるが、内皮機能の変化は認められない。しかし、10週齢のSTZ糖尿病ラットでは、過酸化脂質の増加と弛緩反応の減弱が生じることを報告した (Kobayashi and Kamata, 1999)。このことは、LDLの酸化変性の増加が、STZ糖尿病ラットの血管内皮機能の減弱において、強い影響を及ぼしていることを示している。

エンドセリンやアンジオテンシンは昇圧ペプチドで、内皮細胞由来収縮因子 (endothelium-derived contracting factor; EDCF) の一つであり、血管壁を含む様々な細胞で産生される。現在、これらの収縮物質が内皮細胞の弛緩因子に影響することが示され、糖尿病血管における内皮機能についても研究が進んでいる。これら2つの収縮物質の阻害薬の長期的な投与は、STZ糖尿病動物における血管内皮弛緩反応の減弱を改善する (Pieper and Siebeneich, 2000; Kanie and Kamata, 2002)。糖尿病時は血中ET-1が著明に増加しており (Makino and Kamata, 1998a, b, 2000, 2001, 2002), prepro ET-1の

発現も著明に増加している (Kanie and Kamata, 2002)。糖尿病ラットの血管では、NAD(P)H oxidaseが過剰に発現しており、またsuperoxide anionの産生も著明に増加している。このラットにET-1の拮抗薬 (J-104132) を慢性投与すると、superoxide anionの産生が著明に低下し、内皮細胞の機能は著明に改善する (Kanie and Kamata, 2002)。つまり、糖尿病病態では、ET-1がNAD(P)H oxidaseの発現を誘導し、superoxide anionを過剰に産生し、このsuperoxide anionがNOを不活化することによって内皮細胞の機能を低下することになる。糖尿病病態では、PPAR α 、 γ の発現が著明に低下しているが、ベザフィブラートを慢性投与すると、PPAR α 、 γ 共に増加する。興味あることに、ベザフィブラート慢性投与は血中ET-1濃度を著明に減少するので、prepro ET-1の発現を測定したところ、著明に減少し、NAD(P)H oxidaseの過剰発現も抑制されていた。以上の事実から、糖尿病 (I型) ではPPAR α 、 γ の発現が低下し、これがET-1の発現を促進し、ET-1がNAD(P)H oxidaseの発現を促進し、活性酸素が過剰に産生されることによって内皮細胞の機能が低下することが考えられる (Kanie *et al.*, 2003)。

作成方法が簡単な1型糖尿病モデルは、今後さらに、新規物質の血管内皮細胞機能に対する解析、全く未知の血管内皮細胞シグナリングの解明、あるいはヒト糖尿病性血管細胞障害に対する改善効果について、ブレイクスルー的な役割を担うであろう。

6. 2型糖尿病モデルにおけるEDRFの異常

2型糖尿病モデルとして、現在いくつかの自然発症あるいは実験モデル動物が知られている。しかし、2型糖尿病は遺伝的要因と環境的要因である生活習慣などが複雑に相互作用することにより発症するため、2型糖尿病モデル動物の種類は少ない。また非常に高価であり、さらに血管障害を生じるまで時間がかかるのも現状である。これらの要因によってEDRFについての報告も少ない。

フルクトースを慢性的に負荷することによって作成するフルクトース負荷モデルは、インスリン抵抗を生じ、比較的安易に作成できる2型糖尿病モデルとして報告されている (Reaven, 1991)。このフルクトース負荷マウスを用いた胸部大動脈において、アセチルコリンの弛緩反応の減弱が報告され、またアセチルコリン刺激によって産生されるNO_x量も低下が認められた。しかし、 α_2 作動薬のクロニジンによる内皮依存性弛緩反応とNO_x産生は、アセチルコリン刺激と異なり、フルクトース負荷マウスにおいて増加していた (Kamata and Yamashita, 1999; Kamata *et al.*, 2001)。これと同様に、自然発症2型糖尿病モデルのGKラットにおいて、初期の12週齢では、胸部大動脈 α_{2B} 受容体のmRNA発現

増加と作動薬刺激によるNO_x産生の増加が認められた (Kobayashi *et al.*, 2004)。この2つの2型糖尿病モデルの初期に認められる α_2 受容体を介するNO産生の亢進は、非常に興味深いのが、詳細についてはわかっていない。

自然発症糖尿病モデル (WBN/Kobあるいはdb/db mouse) では、内皮細胞依存性の反応が著明に減弱している (Kamata and Kojima, 1997; Miyata *et al.*, 1992, 1993; Kanie and Kamata, 2000)。またZuckerラットでは、内皮依存性弛緩反応の増加と減弱の双方の報告がある (Sexl *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1999)。さらに、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットにおいては、36週齢において弛緩反応の減弱が報告されている (Sakamoto *et al.*, 1998; Kagota *et al.*, 2000)。この弛緩反応の減弱は、1型糖尿病モデルと同様に、NADPH oxidaseの活性亢進によるスーパーオキシドアニオンの増加が観察され、SODの処置によって血管内皮機能を改善することから、スーパーオキシドアニオンによるNOの不活化が考えられる (Kim *et al.*, 2002)。

我々も最近、GKラットにおけるEDRFの検討を行った (Kobayashi *et al.*, 2004)。糖尿病発症後の初期においては、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応は増加が認められ、同様にNO_x産生や eNOS発現の増加が認められた。しかし、36週齢の終期糖尿病ラットにおいては、内皮依存性弛緩反応の減弱、NO_xの産生の減弱が観察された。しかし、eNOSのmRNAおよびタンパク発現は、糖尿病初期と同様に増加したままであった。このことから、弛緩反応の減弱は、eNOSの活性の低下が考えられる。一方、NOドナーによる内皮非依存性弛緩反応は、GKラットにおいて減弱している報告が多く、グアニル酸シクラーゼの活性低下が報告されている (Sandu *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004)。この自然発症2型糖尿病モデルのGK ラットにおける結果は、NO産生の低下とグアニル酸シクラーゼの活性低下が、同時に進行することを示している。この点においては、1型糖尿病モデルにおけるEDRF弛緩反応障害メカニズムと少し異なっているようであり、さらに検討が必要である。

7. 2型糖尿病モデルにおけるEDRFの改善と治療

2型糖尿病は、インスリン抵抗を生じているため、インスリン抵抗改善薬による治療が中心となるのは言うまでもなく、血管内皮細胞へのインスリン抵抗も同様に改善することが治療方針になる。GKラットとOLETFラットにおいて、インスリン抵抗改善薬であるトログリタゾン、メトホルミンが胸部大動脈のアセチルコリンによる弛緩反応を改善することが報告されている (Yamagishi *et al.*, 2001; Iida *et al.*, 2003)。特に、GKラットにおい

ては、NOドナーであるsodium nitroprusside (SNP)の弛緩反応の改善が顕著に認められている。Sanduら(2000)は、GK ラットのインスリン抵抗状態において、インスリンによる血管平滑筋細胞のミオシン脱リン酸化酵素の活性化が低下していることを報告し、この活性の低下が NOドナーによる弛緩反応の減弱に関与していることを示した。この研究結果は、インスリン抵抗の改善によって、グアニル酸シクラーゼの活性を正常化することを示し、NO機能不全の改善薬として有効性が期待できる。

一方、2型糖尿病時には、small dense LDL等のLDLの変性が生じ、酸化LDLになりやすい。トログリタゾンの慢性投与によって、このLDLの酸化を抑制し、弛緩反応を改善することが報告され (Yamagishi *et al.*, 2001)、1型糖尿病モデルと同様に、酸化LDLの血管内皮機能への影響が示されている。以上の報告は共に、インスリン抵抗の改善であり、インスリンの作用低下が原因であることを示している。また、2型糖尿病モデルも1型糖尿病モデルと同様に、NADPH oxidaseによるスーパーオキシドの増加が内皮機能の減弱を生じ、SODの処置によって改善することが報告されている (Kim *et al.*, 2002)。

今後、自然発症の2型糖尿病モデルを用いた研究が進むと考えられるが、現在においても非常に高価であると同時に、STZ等によって作成する糖尿病モデルと比べ、血管内皮細胞障害を生じるまでに時間がかかるという問題点が残る。1型糖尿病ラットにおける弛緩反応の減弱、及びその改善作用において、いくつか共通する部分が多く、活性酸素、LDL等はその例であるが、まだ実験データは少ない。この点を考えると、今後は1型糖尿病ラットモデルにおける血管反応との比較検討と2型糖尿病モデルにおける独自の原因究明の必要があるのかもしれない。

8. 1型、2型糖尿病モデルにおけるEDHFの異常

血管内皮細胞にブラジキニン、アセチルコリン等が作用すると、NOやプロスタサイクリンが産生され、平滑筋細胞が弛緩するが、これらとは異なるEDHFも産生され、膜の過分極を引き起こし弛緩する。そのEDHFは未だその本体は同定されていないが、いくつかの候補因子が挙がってきている。cytochrome P-450の代謝産物であるepoxyeicosatrienoic acids (EETs) (Rosolowsky and Campbell, 1993; Fisslthaler B *et al.*, 1999)、内皮細胞由来K⁺イオン (Edwards *et al.*, 1998; Makino and kamata, 2000)、過酸化水素 (H₂O₂) (Matoba *et al.*, 2000) などがこれまで種々の血管にて報告されている。また、内皮細胞と平滑筋細胞間の電気的結合を担うgap junction (Yamamoto *et al.*, 1998, 1999, 2001; Edwards

et al., 2000) がEDHFの作用に関与することも報告されている。これらの詳細に関してはいくつかの総説 (McGuire *et al.*, 2001; Busse *et al.*, 2002) がある。またEDHFと種々の病態時における内皮機能障害についても、総説が出されている (Brandes *et al.*, 1997; Fujii and Abe, 2002; Gschwend *et al.*, 2003)。そこで本総説では、最近の実験結果を中心に報告する。

1型糖尿病モデル動物では、STZ誘発糖尿病ラット腸間膜動脈においてアセチルコリンによる内皮依存性過分極及び弛緩反応が減弱していることをFukaoら (1997) が報告し、その後、同様の結果を当研究室も含めいくつかのグループが報告している (Kamata *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2000; Wigg *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2003)。また、STZ誘発糖尿病ラットの腎細小血管の障害についてもEDHFの関与が指摘されている (De Vriese *et al.*, 2000a)。一方、2型糖尿病モデル動物であるOLETFラットにおいても、EDHF様弛緩反応が減弱していることが報告されている (Minami *et al.*, 2002)。さらに我々はSTZとニコチンアミドを処置することによって作製した2型糖尿病モデルにおいても、腸間膜動脈においてEDHF様弛緩反応が減弱していることを確認している (Matsumoto *et al.*, 2004)。高フルクトース食負荷によるインスリン抵抗性モデル動物においては、cytochrome P450活性が低下し、その結果、EDHF様弛緩反応が減弱する。さらに、この酵素を誘導することによって内皮機能障害が改善されたことが報告されている (Katakam *et al.*, 2000)。このように、糖尿病性血管障害とEDHFとの関係については、近年のEDHFの同定によって明らかにされつつあり、今後、さらに研究が進むことが期待される。

9. 1型、2型糖尿病モデルにおける

EDHFの改善と治療

EDHFは血管径が小さくなればなるほどその寄与が大きいたと考えられているため、糖尿病性血管障害におけるEDHFの役割および障害メカニズムを解明することは、糖尿病性腎症、網膜症、神経障害といった細小血管障害の治療に大いに役立つと考えられるが、EDHFの改善効果に関する実験報告はほとんどないと言ってよい。最近、動物モデルではないが、臨床に関してEDHFについて報告された。糖尿病患者が勃起不全 (ED) を起こした場合の治療薬とされているsildenafil (ホスホジエステラーゼ-5 阻害薬) の効果が非糖尿病患者より悪いことが知られている。この原因の一つとしてEDHFの減弱によることが明らかとなり、陰茎動脈においてEDHFの作用を増強させるcalcium dobesilate が糖尿病患者のEDの治療に有効である可能性が報告された (Angulo *et al.*, 2003)。STZ誘発糖尿病ラット腎細小血管の障害につい

てEDHFの減弱が、葉酸の慢性処置により改善効果が認められることが報告されたが、機序等は不明である (De Vriese *et al.*, 2000a)。

先に述べたように、EDHF様弛緩反応にはgap junctionが関与するが、セカンドメッセンジャーであるcyclic AMPがこのgap junctionを介する電氣的伝導を促進し、EDHFシグナリングの調節因子として働くことがラット腸間膜動脈において最近報告された (Griffith *et al.*, 2002)。我々は、STZ誘発糖尿病ラット腸間膜動脈において、cyclic AMPを分解するホスホジエステラーゼ-3の阻害薬が、EDHF様弛緩反応を改善することを報告した (Matsumoto *et al.*, 2003)。さらに糖尿病時においてホスホジエステラーゼ-3発現と活性増加が生じ、その結果cyclic AMPが低下することによってEDHFの調節機構に障害をきたしている可能性を見いだした (Matsumoto *et al.*, 2003)。また、cyclic AMPシグナリングの下流に位置するプロテインキナーゼA活性が糖尿病時において低下することも見だし (Matsumoto *et al.*, 論文投稿中)、cyclic AMPシグナリング全体の異常が考えられるのかもしれない。これらの実験結果は、cyclic AMPシグナリングの異常を改善することが、EDHFの改善を生じる可能性を示し、非常に興味深い実験結果である。

10. 終わりに

本総説では、糖尿病モデルにおけるEDRF、EDHFについてまとめた。1型糖尿病モデル特にSTZ誘発糖尿病モデルを用いたEDRFの異常と改善に関して、現存する物質については、ほぼ解明されている。その原因としては、1型、2型糖尿病モデルとも、スーパーオキシド等の活性酸素の増加が関与している報告が一番多く、出発点、つまり様々な原因物質は違うが、最終的に活性酸素の増加が、EDRFの機能不全を増強しているのかもしれない。

今後は、新たな遺伝子による血管内皮細胞への作用の検討を行う。また、昇圧性ペプチドや成長ホルモン等が相互作用を起こしている可能性や、その他の物質との関連性についても詳細に検討する。EDHFについては、本体は未だ確定しておらず、改善治療効果についても同様に報告は少ない。しかし、様々な血管部位によるEDHFを介した弛緩反応がcyclic AMP系によって増強され、糖尿病ではこのcyclic AMPの濃度が減少しているのので、cyclic AMP濃度を上昇させるホスホジエステラーゼ-3阻害薬が治療薬の候補として挙がってきている。しかし、この点についても今後の詳細な研究が必要であろう。

文 献

- Abiru, T., Kamata, K. and Kasuya, Y. (1991). Effects of chronic diabetes on vascular responses of basilar artery and aorta from rabbits with alloxan-induced diabetes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **74**: 71-87.
- Abiru, T., Kamata, K., Miyata, N. and Kasuya, Y. (1990a). Differences in vascular responses to vasoactive agents of basilar artery and aorta from rabbits with alloxan-induced diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68**: 882-888.
- Abiru, T., Watanabe, Y., Kamata, K. and Kasuya, Y. (1993). Changes in endothelium-dependent relaxation and levels of cyclic nucleotides in effluent of perfused mesenteric arterial bed in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **53**: PL7-PL12.
- Abiru, T., Watanabe, Y., Kamata, K., Miyata, N. and Kasuya, Y. (1990b). Decrease in endothelium-dependent relaxation and levels of cyclic nucleotides in aorta from rabbits with alloxan-induced diabetes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **68**: 13-25.
- Angulo, J., Cuevas, P., Fernandez, A., Gabancho, S., Allona, A., Martin-Morales, A., Moncada, I., Videla, S. and Saenz de Tejada, I. (2003). Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**: 1202-1208.
- Bolton, T.B., Lang, R.J. and Takewaki, T. (1984). Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol.* **351**: 549-572.
- Brendes, R.P., Behra, A., Lebherz, C., Boger, R.H., Bode-Boger, S.M., Phivthong-Ngam, L. and Mugge, A. (1997). N^G-nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. **135**: 49-55.
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M. and Weston, A.H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends. Pharmacol. Sci.* **23**: 374-380.
- Calver, A., Collier, J. and Vallance, P. (1992). Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **90**: 2548-2554.
- Chen, G., Suzuki, H. and Weston, A.H. (1988). Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* **95**: 1165-1174.
- Chen, G., Yamamoto, Y., Miwa, K. and Suzuki, H. (1991). Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *Am. J. Physiol.* **260**: H1888-H1892.

- Chen, G. and Suzuki, H. (1990). Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J. Physiol.* **421**: 521-534.
- Clarkson, P., Celermajor, D.S., Donald, A.E., Sampson, M., Sorensen, K.E., Adams, M., Yue, D.K., Betteridge, D.J. and Deanfield, J.E. (1996). Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J. Am. Coll. Cardiol.* **28**: 573-579.
- De Vriese, A.S., Van de Voorde, J., Blom, H.J., Vanhoutte, P.M., Verbeke, M. and Lameire, N.H. (2000a). The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin-induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*. **43**: 1116-1125.
- De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H. and Vanhoutte, P.M. (2000b). Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* **130**: 963-974.
- Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J. and Weston, A.H. (1998). K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. **396**: 269-272.
- Edwards, G., Thollon, C., Gardener, M.J., Feletou, M., Vilaine, J., Vanhoutte, P.M. and Weston, A.H. (2000). Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.* **129**: 1145-1154.
- Elliott, T.G., Cockcroft, J.R., Groop, P.H., Viberti, G.C., and Ritter, J.M. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin. Sci.* **85**: 687-693.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I. and Busse, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. **401**: 493-497.
- Flavahan, N.A. (1992). Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*. **85**:1927-1938.
- Fujii, K. and Abe, I. (2002). Angiotensin II receptor antagonist improves age-related impairment of EDHF-mediated hyperpolarization. *Nippon Rinsho*. **60**: 1949-1956.
- Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I. and Kitabatake, A. (1997). Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* **121**: 1383-1391.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. **288**: 373-376.
- Grant, M.B., Wargovich, T.J., Ellis, E.A., Caballero, S., Mansour, M. and Pepine, C.J. (1994). Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis? *Circulation*. **89**: 1511-1517.
- Griffith, T.M., Chaytor, A.T., Taylor, H.J., Giddings, B.D. and Edwards, D.H. (2002). cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electronic conduction via gap junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 6392-6397.
- Gschwend, S., Buikema, H., Henning, R.H., Pinto, Y.M., de Zeeuw, D. and van Gilst, W.H. (2003). Endothelial dysfunction and infarct-size relate to impaired EDHF response in rat experimental chronic heart failure. *Eur. J. Heart. Fail.* **5**: 147-154.
- Hink, U., Li H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaïss, F., Stahl, R.A., Warnholtz, A., Meinertz, T., Griendling, K., Harrison, D.G., Forstermann, U. and Munzel, T. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* **88**:E14-E22.
- Huvers, F.C., Schaper, N.C., Houben, A.J., Hofstra, L., Kitslaar, P.J., De Leeuw, P.W. and Nieuwenhuijzen Kruseman, A.C. (1997). Impaired arterial but not venous responsiveness to nitroglycerin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**:360-365.
- Iida, K.T., Kawakami, Y., Suzuki, M., Shimano, H., Toyoshima, H., Sone, H., Shimada, K., Iwama, Y., Watanabe, Y., Mokuno, H., Kamata, K. and Yamada, N. (2003). Effect of thiazolidinediones and metformin on LDL oxidation and aortic endothelium relaxation in diabetic GK rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**: E1125-E1130.
- Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Komatsu, R., Doi, K., Ogawa, Y., Tamura, N., Takaya, K., Igaki, T., Yamashita, J., Chun, T.H., Masatsugu, K., Becker, A.E. and Nakao, K. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. **98**: 2108-2116.
- Jaap, A.J. and Tooke, J.E. (1995). Pathophysiology of microvascular disease in non-insulin-dependent diabetes. *Clin. Sci.* **89**: 3-12.
- Kagota, S., Yamaguchi, Y., Nakamura, K. and Kunitomo, M. (2000). Altered endothelium-dependent responsiveness in the aorta and renal arteries of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Gen. Pharmacol.* **34**: 201-209.
- Kamata, K. and Hosokawa, M. (1997). Endothelial dysfunction of the perfused kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **96**: 57-70.
- Kamata, K., Kanie, N. and Inose, A. (2001). Mechanisms underlying attenuated contractile response of aortic rings to noradrenaline in fructose-fed mice. *Eur. J. Pharmacol.* **428**: 241-249.
- Kamata, K. and Kobayashi, T. (1996). Changes in superoxide dismutase mRNA expression by streptozotocin-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* **119**: 583-589.

- Kamata, K. and Kojima, S. (1997). Characteristics of contractile response of the aorta to norepinephrine in db/db mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **96**: 319-328.
- Kamata, K. and Kondoh, H. (1996). Impairment of endothelium-dependent relaxation of the isolated basilar artery from streptozotocin-induced diabetic rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **94**: 239-249.
- Kamata, K., Kojima, S., Sugiura, M. and Kasuya, Y. (1996a). Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed mice by the chronic administration of prazosin or pravastatin. *Jpn. J. Pharmacol.* **70**: 149-156.
- Kamata, K., Miyata, N. and Kasuya, Y. (1989a). Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* **97**: 614-618.
- Kamata, K., Miyata, N. and Kasuya, Y. (1989b). Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in native and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**: 890-894.
- Kamata, K., Ohuchi, K. and Kirisawa, H. (2000). Altered endothelium-dependent and -independent hyperpolarization and endothelium-dependent relaxation in carotid arteries isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **362**: 52-59.
- Kamata, K., Sugiura, M., Kojima, S. and Kasuya, Y. (1996b). Restoration of endothelium-dependent relaxation in both hypercholesterolemia and diabetes by chronic taurine. *Eur. J. Pharmacol.* **303**: 47-53.
- Kamata, K., Sugiura, M., Kojima, S. and Kasuya, Y. (1996c). Preservation of endothelium-dependent relaxation in cholesterol-fed and streptozotocin-induced diabetic mice by the chronic administration of cholestyramine. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 385-391.
- Kamata, K. and Yamashita, K. (1999). Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilatation in fructose-fed hypertensive rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **103**: 195-210.
- Kanie, N. and Kamata, K. (2000a). Contractile responses in spontaneously diabetic mice. I. Involvement of superoxide anion in enhanced contractile response to aorta to norepinephrine in C57/BL/KsJ(db/db) mice. *Gen. Pharmacol.* **35**: 311-318.
- Kanie, N. and Kamata, K. (2000b). Contractile responses in spontaneously diabetic mice. II. Effect of cholestyramine on enhanced contractile response of aorta to norepinephrine in C57/BL/KsJ(db/db) mice. *Gen. Pharmacol.* **35**: 319-323.
- Kanie, N. and Kamata, K. (2002). Effects of chronic administration of the novel endothelin antagonist J-104132 on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* **135**: 1935-1942.
- Kanie, N., Matsumoto, T., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2003). Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPARalpha and PPARgamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* **140**: 23-32.
- Katakam, P.V., Hoenig, M., Ujhelyi, M.R. and Miller, A.W. (2000). Cytochrome P450 activity and endothelial dysfunction in insulin resistance. *J. Vasc. Res.* **37**: 426-434.
- Keaney, J.F. Jr. and Vita, J.A. (1995). Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **38**: 129-154.
- Kim, Y.K., Lee, M.S., Son, S.M., Kim, I.J., Lee, W.S., Rhim, B.Y., Hong, K.W. and Kim, C.D. (2002). Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes.* **51**: 522-527.
- Kobayashi, T. and Kamata, K. (1999a). Relationship among cholesterol, superoxide anion and endothelium-dependent relaxation in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **367**: 213-222.
- Kobayashi, T. and Kamata, K. (1999b). Effect of insulin treatment on smooth muscle contractility and endothelium-dependent relaxation in rat aortae from established STZ-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* **127**: 835-842.
- Kobayashi, T. and Kamata, K. (2002). IGF-1 receptor or VEGF mRNA expression by chronic high dose insulin-treatment in aorta from control or established diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**: H1761-H1768.
- Kobayashi, T. and Kamata, K. (2001). Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats. *Atherosclerosis.* **155**: 313-320.
- Kobayashi, T., Matsumoto, T. and Kamata, K. (2000). Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent aortic relaxation seen in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* **131**: 231-238.
- Kobayashi, T., Matsumoto, T., Oishi, K. and Kamata, K. (2004). Differential expressions of α 2D-adrenoceptor and eNOS in aortae from early and later stages of diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* in press.
- Komori, K. and Suzuki, H. (1987). Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ. Res.* **61**: 586-593.
- Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N., Ha, S.W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E.P., Herbert, T.P., Rhodes, C.J. and King, G.L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation.* **101**: 676-681.
- Kugiyama, K., Kerns, S.A., Morrisett, J.D., Roberts, R. and Henry, P.D. (1990). Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature.* **344**: 160-162.
- Lambert, J., Aarsen, M., Donker, A.J. and Stehouwer, C.D. (1996). Endothelium-dependent and -independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 705-711.
- Makino, A. and Kamata, K. (1998a). Elevated plasma endothelin-1 level in streptozotocin-induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 1065-1072.

- Makino, A. and Kamata, K. (1998b). Possible modulation by endothelin-1, nitric oxide, prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ of vasoconstriction induced by an α -agonist in mesenteric arterial bed from diabetic rats. *Diabetologia* **41**: 1410-1418.
- Makino, A. and Kamata, K. (2000). Time-course changes in plasma endothelin-1 and its effects on the mesenteric arterial bed in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **2**: 47-55.
- Makino, A., Oda, S. and Kamata, K. (2001). Mechanisms underlying increased release of endothelin-1 from the aorta in diabetic rat. *Peptides* **22**: 639-645.
- Makino, A. and Kamata, K. (2002). Effects of chronic administration of L-arginine on vasoactive responses induced by endothelin-1 and its plasma level in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Smooth Muscle Res.* **38**: 101-115.
- Makino, A., Ohuchi, K. and Kamata, K. (2000). Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* **130**: 549-556.
- Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H. and Takeshita, A. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest.* **106**: 1521-1530.
- Matsumoto, T., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2003). Alterations in EDHF-type relaxation and phosphodiesterase activity in mesenteric arteries from diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **285**: H283-H291.
- Matsumoto, T., Wakabayashi, K., Kobayashi, T. and Kamata, K. (2004). Alterations in vascular endothelial function in the aorta and mesenteric artery in type II diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**: 175-182.
- McGuire, J.J., Ding, H. and Triggle, C.R. (2001). Endothelium-derived relaxing factors: A focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 443-470.
- McNally, P.G., Watt, P.A., Rimmer, T., Burden, A.C., Hearnshaw, J.R. and Thurston, H. (1994). Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Sci.* **87**: 31-36.
- Minami, A., Ishimura, N., Harada, N., Sakamoto, S., Niwa, Y. and Nakaya, Y. (2002). Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis* **162**: 85-92.
- Miyata, N., Yamaura, H., Tsuchida, K., Otomo, S., Kamata, K. and Kasuya, Y. (1992). Changes in responsiveness of the aorta to vasorelaxant agents in genetically diabetic rats: A study in WBN/Kob rats. *Life Sci.* **50**: 1363-1369.
- Miyata, N., Tsuchida, K., Okuyama, S., Otomo, S., Kamata, K. and Kasuya, Y. (1992). Age-related changes in endothelium-dependent relaxation in aorta from genetically diabetic rats. A study in WBN/Kob rats. *Am. J. Physiol.* **262**: H1104-H1109.
- Miyata, N., Yamaura, H., Tsuchida, K., Otomo, S., Kamata, K. and Kasuya, Y. (1993). Impairment of endothelium-dependent relaxation of mesenteric artery in aged genetically diabetic rats. A study in WBN/Kob rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**: 297-300.
- Nitenberg, A., Valensi, P., Sachs, R., Dali, M., Aptekar, E. and Attali, J.R. (1993). Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes* **42**: 1017-1025.
- Oyama, Y., Kawasaki, H., Hattori, Y. and Kanno, M. (1986). Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* **132**: 75-78.
- Pieper, G.M. (1997). Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **29**: 8-15.
- Pieper, G.M. (1998). Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension* **31**: 1047-1060.
- Pieper, G.M. (1999). Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia* **42**: 204-213.
- Pieper, G.M. and Siebeneich, W. (2000). Temocapril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, protects against diabetes-induced endothelial dysfunction. *Eur. J. Pharmacol.* **403**: 129-132.
- Poston, L. and Taylor, P.D. (1995). Endothelium-mediated vascular function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Sci.* **88**: 245-255.
- Reaven, G.M. (1991). Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabetes. Care* **14**: 195-202.
- Rosolowsky, M. and Campbell, W.B. (1993). Role of PGI₂ and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. *Am. J. Physiol.* **264**: H327-H335.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* **362**: 801-809
- Saenz de Tejada, I., Goldstein, I., Azadzi, K., Krane, R.J. and Cohen, R.A. (1989). Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N. Engl. J. Med.* **320**: 1025-1030.
- Sakamoto, S., Minami, K., Niwa, Y., Ohnaka, M., Nakaya, Y., Mizuno, A., Kuwajima, M. and Shima, K. (1998). Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes* **47**: 82-86.
- Sandu, O.A., Ragolia, L. and Begum, N. (2000). Diabetes in the Goto-Kakizaki rat is accompanied by impaired insulin-mediated myosin-bound phosphatase activation and vascular smooth muscle cell relaxation. *Diabetes* **49**: 2178-2189.
- Sexl, G., Raberger, G. and Schutz, W. (1995). Age-related changes in vascular reactivity in genetically diabetic rats. *Pharmacology* **50**: 238-246.

- Smits, P., Kapma, J.A., Jacobs, M.C., Lutterman, J. and Thien, T. (1993). Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with type I diabetes. *Diabetes*. **42**: 148-153.
- Standley, P.R., Bakir, M.H. and Sowers, J.R. (1993). Vascular insulin abnormalities, hypertension, and accelerated atherosclerosis. *Am. J. Kidney. Dis.* **21**: 39-46.
- Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G. and Baron, A.D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **97**: 2601-2610.
- Takiguchi, Y., Satoh, N., Hashimoto, H. and Nakashima, M. (1988). Changes in vascular reactivity in experimental diabetic rats: comparison with hypothyroid rats. *Blood. Vessels.* **25**: 250-260.
- Tesfamariam, B. (1994). Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free. Radic. Biol. Med.* **16**: 383-391.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **329**: 977-986.
- Ting, H.H., Timimi, F.K., Boles, K.S., Creager, S.J., Ganz, P. and Creager, M.A. (1996). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **97**: 22-28.
- Tomlinson, K.C., Gardiner, S.M., Hebden, A. and Bennett, T. (1992). Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.* **44**: 103-150.
- Walker, A.B., Chattington, P.D., Buckingham, R.E. and Williams, G. (1999). The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*. **48**: 1448-1453.
- Wigg, S.J., Tare, M., Tonta, M.A., O'Brien, R.C., Meredith, I.T. and Parkington, H.C. (2001). Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **281**: H232-H240.
- Witte, K., Jacke, K., Stahrenberg, R., Arlt, G., Reitenbach, I., Schilling, L. and Lemmer, B. (2002). Dysfunction of soluble guanylyl cyclase in aorta and kidney of Goto-Kakizaki rats: influence of age and diabetic state. *Nitric. Oxide.* **6**: 85-95.
- Yamagishi, T., Saito, Y., Nakamura, T., Takeda, S., Kanai, H., Sumino, H., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Kurabayashi, M. and Nagai, R. (2001). Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens. Res.* **24**: 705-709.
- Yamamoto, Y., Fukuta, H., Nakahira, Y. and Suzuki, H. (1998). Blockade by 18 β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J. Physiol.* **511**: 501-508.
- Yamamoto, Y., Imaeda, K. and Suzuki, H. (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J. Physiol.* **514**: 505-513.
- Yamamoto, Y., Klemm, M.F., Edwards, F.R. and Suzuki, H. (2001). Intercellular electrical communication among smooth muscle and endothelial cells in guinea-pig mesenteric arterioles. *J. Physiol.* **535**: 181-195